

O uso da citometria de fluxo como critério de cura e aplicabilidade diagnóstica na leishmaniose tegumentar americana (LTA)

The use of flow cytometry as a criteria for healing and diagnostic applicability in american tegumentary leishmaniosis (LTA)

Recebimento dos originais: 02/11/2018

Aceitação para publicação: 04/12/2018

Allana Maria de Souza Pereira

Discente do curso de graduação em Bacharelado em Ciências Biológicas da Universidade Federal Rural de Pernambuco - UFRPE. Rua Dom Manuel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos - Recife/PE.
Email: allanamariasp@gmail.com

Beatriz Coutinho de Oliveira

Biomédica, Doutoranda em Inovação Terapêutica, Instituto Aggeu Magalhães/FIOCRUZ-PE. Av. Prof Moraes Rego, s/n - Campus da UFPE - Cidade Universitária, Recife – PE
Email: oliveira.cbeatriz@gmail.com

Andresa Pereira de Oliveira Mendes

Bióloga, Doutora em Inovação Terapêutica, Instituto Aggeu Magalhães/FIOCRUZ-PE. Av. Prof Moraes Rego, s/n - Campus da UFPE - Cidade Universitária, Recife - PE.
Email: andresadeolinda@gmail.com

Valéria Rêgo Alves Pereira

Biomédica, Doutora em Biologia Celular e Molecular pela Fundação Oswaldo Cruz, Brasil, Pesquisador do Instituto Aggeu Magalhães/FIOCRUZ-PE, Brasil. Av. Prof Moraes Rego, s/n - Campus da UFPE - Cidade Universitária, Recife – PE.
Email: valeriaph@gmail.com

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar a participação da resposta imune humoral no desenvolvimento de lesões cutâneas e na resposta ao tratamento em indivíduos portadores de LTA através da citometria de fluxo. Foi realizado um estudo primário, analítico e experimental com ensaios in vitro. Amostras de soros foram inativadas e formas promastigotas de *Leishmania (V.) braziliensis* foram obtidas a partir da cepa de referência, expandidas em meio Schneider's até atingir a fase exponencial. Após diversas etapas, uma alíquota de parasitos foi contada e a concentração ajustada para os ensaios de citometria de fluxo. Como resultados da avaliação da aplicabilidade da Imunoglobulina G em detectar pacientes com LTA ativa, dos 51 pacientes testados, 83,23% foram considerados positivos. Os pacientes foram tratados com a dose 15ml/kg de Glucantime, durante 20 dias, correspondente a um ciclo da medicação. Após 5 meses de tratamento, foi realizado um ensaio com o soro desses pacientes após o tratamento (PT) e foi comparado com os ensaios realizados antes do tratamento (AT). Não houve diferença significativa em relação aos títulos AT e PT. Por conseguinte, com os resultados obtidos, pode-se sugerir que a IgG é aplicável ao diagnóstico da LTA, uma vez que o teste se mostrou positivo para pacientes com a forma ativa da doença, contribuindo para uma técnica mais específica. Para obter uma diferença significativa entre os

títulos AT e PT e determinar um critério de cura laboratorial, é necessário um intervalo de tempo maior para o tratamento, permanecendo como perspectiva continuar o acompanhamento dos pacientes, avaliando-se a redução dos seus títulos.

Palavras- chaves: L.V.braziliensis; Imunologia; Isotipos; Diagnóstico; Anticorpos

ABSTRACT

The objective of this work was to evaluate the participation of the humoral immune response in the development of skin lesions and the response to treatment in individuals with ATL by flow cytometry. A primary, analytical and experimental study was carried out with in vitro assays. Serum samples were inactivated and promastigote forms of *Leishmania* (V.) *braziliensis* were obtained from the reference strain, expanded in Schneider's medium until reaching the exponential phase. After several steps, an aliquot of parasites was counted and the concentration adjusted for the flow cytometry assays. As a result of the evaluation of the applicability of immunoglobulin G to detect patients with active ACL, of the 51 patients tested, 83.23% were considered positive. Patients were treated with the 15ml / kg Glucantime dose for 20 days, corresponding to one cycle of the medication. After 5 months of treatment, a serum test of these patients was performed after treatment (PT) and compared with the pre-treatment (AT) tests. There was no significant difference in relation to AT and PT titers. Therefore, with the results obtained, it can be suggested that IgG is applicable to the diagnosis of ATL, since the test was positive for patients with the active form of the disease, contributing to a more specific technique. In order to obtain a significant difference between the AT and PT titers and to determine a laboratory cure criterion, a longer treatment period is necessary, with the aim of continuing the follow-up of the patients, evaluating the reduction of their titers.

Keywords: L.V.braziliensis; Immunology; Isotypes; Diagnosis; Antibodies

1 INTRODUÇÃO

A Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) é uma doença infecciosa, não contagiosa, considerada emergente e negligenciada. É endêmica em 98 países, distribuída em quatro continentes: Ásia, África, Europa e América apresentando uma média de 1,3 milhões de casos anuais. No Brasil é considerada a segunda doença de maior prevalência, com casos confirmados em todos os estados, sendo as regiões Norte, Nordeste e Centro-Oeste consideradas endêmicas para a doença (BRANDÃO-FILHO *et al.*, 1994; TIUMAN *et al.*, 2011; NEGRÃO; FERREIRA, 2014).

Essa infecção tem como agente causador protozoários de diversas espécies pertencentes ao gênero *Leishmania*, onde a espécie *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* é considerada o agente específico da LTA no Brasil, e é transmitida por insetos vetores dos gêneros *Phlebotomus* (Velho Mundo) ou *Lutzomyia* (Novo Mundo) (SAVOIA, 2015; BRASIL, 2017). Essa doença é responsável por desencadear infecções assintomáticas, pode comprometer a pele com lesões cutâneas localizadas, disseminadas ou difusas, como também, pode se apresentar em formas mais graves com lesões nas mucosas, denominada de forma mucocutânea (SOUZA *et al.*, 2013; ARONSON, 2016).

Já foi descrito que o mecanismo protetor da LTA é dependente de células T e existe uma diferença entre resistência e susceptibilidade à infecção relacionada com o nível de expansão de células T do tipo TH1 ou TH2 (BACELLAR *et al.*, 2002; DE LUCA; MACEDO, 2016). Estudos sobre a resposta imune humoral na LTA demonstram o papel dessas células como células apresentadoras de antígeno (APCs), na produção de citocinas pró-inflamatórias e regulatórias, como também, promovendo a lise dos parasitos em sinergia com o sistema complemento (PEDRAS *et al.*, 2003; FAGUNDES-SILVA *et al.*, 2012; PEREIRA *et al.*, 2012; DE PAIVA-CAVALCANTI *et al.*, 2015). Assim, a análise de anticorpos anti-*Leishmania* permite avaliar o curso evolutivo da infecção e fornecer dados sobre as características da resposta imune. Diversos perfis de imunoglobulinas específicas para *Leishmania* têm sido detectados em pacientes com LTA em todas as manifestações clínicas e a intensidade da resposta está relacionada com a carga parasitária, espécie do parasito, cronicidade da infecção e a fatores intrínsecos do próprio hospedeiro (TRUJILLO *et al.*, 2000; REIS, 2007; DE OLIVEIRA *et al.*, 2013; ROMERO GA *et al.*, 2005). Pesquisas já correlacionaram as diversas manifestações clínicas de LTA com as diferentes subclasses de IgG, como nas leishmanioses cutânea e mucocutânea a resposta do tipo Th1 tem sido associada com a presença de isotipos IgG1, IgG2 e IgG3, já a resposta do tipo Th2 está atrelada com a presença de IgG4 para a leishmaniose cutânea difusa (SOUZA *et al.*, 2005; RODRIGUEZ *et al.*, 1996).

O diagnóstico das leishmanioses é comumente realizado por uma associação de fatores, com base em características clínicas, dados epidemiológicos e testes laboratoriais. Como já mencionado, as leishmanioses podem se apresentar sob diversas formas clínicas, onde essas características são facilmente confundidas com outras doenças como: câncer de pele, esporotricose, sífilis, entre outras (REITHINGER *et al.*, 2007, FERREIRA, 2018). Assim, um diagnóstico precoce e diferencial, com redução nos níveis de reatividade cruzada com outras doenças semelhantes, se mostra uma medida crucial para o controle da LTA. Devido ao fato de que não existe uma técnica de diagnóstico considerada padrão-ouro um grande número de técnicas para o diagnóstico laboratorial foi descrito na literatura variando na precisão dos resultados (GOTO, 2010).

A citometria de fluxo é uma tecnologia que vem sendo estudada para ser implementada ao diagnóstico, tecnologia que promove a análise simultânea de diferentes características físicas de partículas individuais, conforme um fluxo de fluido desloca-se através de um feixe de luz, possibilitando detecção e análise quantitativa de anticorpos (PEDRAL-SAMPAIO *et al.*, 2016; DE OLIVEIRA *et al.*, 2013). A técnica apresenta vantagens em relação aos outros imunoensaios, como a possibilidade de quantificação do analito, volume reduzido de amostra, grande reprodutibilidade e sensibilidade, além de capacidade para multiplexagem (SOUSA *et al.*, 2013). Simultaneamente

estudos têm avaliado a redução dos níveis de anticorpos em pacientes de LTA após tratamento quimioterápico, esse fato impulsionou o uso da citometria de fluxo para além de diagnosticar, estabelecer um critério de cura (PEREIRA, V. R. et al., 2012, DE OLIVEIRA et al., 2013).

Diante das perspectivas oferecidas por citometria de fluxo relatado por Martins- Filho et al., (1995), e considerando que o uso de isotipos pode colaborar com uma maior acurácia nos testes (PISSINATE *et al.*, 2008), o atual projeto tem como objetivo avaliar, através de citometria de fluxo, a participação da resposta imune humoral no desenvolvimento de lesões cutâneas e na resposta ao tratamento em indivíduos portadores de LTA. Contribuindo para a obtenção de um método de diagnóstico com maior sensibilidade e especificidade e como uma ferramenta para determinação de um critério de cura para a doença.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

Um estudo primário, analítico e experimental com ensaios *in vitro* foi realizado e avaliados 51 soros de pacientes procedentes de de Moreno, Zona da Mata de Pernambuco, considerada área endêmica para LTA. Eles eram portadores de lesões ativas, de ambos os sexos e com idade superior a 15 anos. Esses pacientes receberam atendimento no ambulatório do Instituto Aggeu Magalhães (IAM), onde ficaram cientes do objetivo do estudo e concordaram em assinar o “Termo de Consentimento Livre e Esclarecido” (TCLE). Além dos pacientes citados, adicionou-se ao estudo soros de pacientes após início do tratamento quimioterápico com a dose 15ml/kg da droga Glucantime. Os protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa do IAM/FIOCRUZ (CAAE 11083812.7.0000.5190). Se obteve o soro através da centrifugação das amostras de sangue em temperatura ambiente, e depois inativado em banho-maria a 56°C por 30 minutos. Para obtenção das formas promastigotas de *Leishmania (V.) braziliensis*, utilizou-se uma amostra da cepa de referência, expandida em meio Schneider’s até atingir a fase exponencial. Após diversas etapas, realizou-se uma contagem da alíquota de parasitos e a concentração ajustada para os ensaios de citometria de fluxo. O ensaio de citometria de fluxo foi realizado de acordo com Rocha *et al.* (2002). Utilizando uma placa de 96 poços com o fundo em “U”, incubou-se uma alíquota de parasitas na placa a 37°C por 30 minutos na presença de diferentes diluições do soro (1:64 a 1:8192). Após incubação com soros, ocorreram duas lavagens dos parasitos com 150 µ de PBS-10% SFB (1000 X g por 10 minutos, a temperatura ambiente). Em seguida, os parasitos incubados a 37°C por 30 minutos ao abrigo da luz, com a imunoglobulina G, lavados duas vezes e posteriormente incubados nas mesmas condições com o fluorocromo estraptavidina-ficoeritrina (PE) (Sigma Chemical Corp., St. Louis, MO) diluída 1:200 em PBS-10% SFB. Após as lavagens, os parasitos marcados foram fixados com 200uL de solução fixadora e mantidos por até 24 horas a

4°C, ao abrigo de luz, até a leitura no citômetro de fluxo. A análise estatística dos dados ocorreram no Laboratório de Métodos Quantitativos do Núcleo de Saúde Coletiva do IAM FIOCRUZ-PE, empregando-se testes não paramétricos. Todas as conclusões tomadas consideraram um nível de significância de 95%. Os gráficos construídos utilizaram o software MedCalc Statistical para avaliar e o desempenho dos testes, sensibilidade e especificidade.

3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

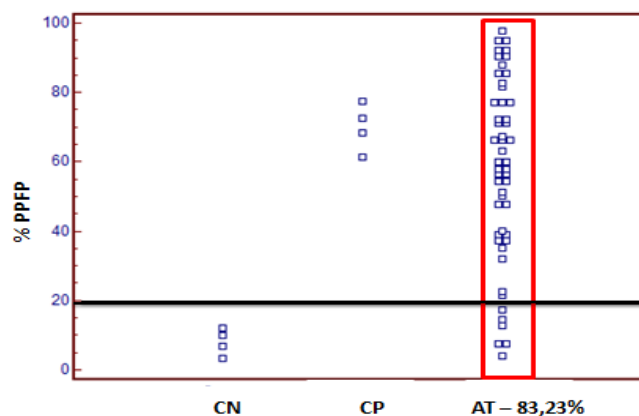
3.1. Aplicabilidade da imunoglobulina G na detecção de pacientes com LTA

No presente estudo propusemos a utilização da citometria de fluxo como uma ferramenta para ser implementada no diagnóstico e também para o critério de cura da LTA através do uso da imunoglobulina G. Uma das grandes dificuldades no controle da LTA está associada ao fato de que ainda não existe uma técnica de diagnóstico que seja considerada o padrão-ouro e o diagnóstico final é obtido através de uma associação de fatores clínicos, epidemiológicos e laboratoriais (NEVES, 2002). Guitierrez (1991) demonstrou que ao realizar uma análise de anticorpos anti-*Leishmania* é possível avaliar o curso da infecção, como também fornece dados sobre características da resposta imune. Com isso, estudos tem focado na análise desses anticorpos e diversos perfis de imunoglobulinas específicas para *Leishmania* foram detectadas em pacientes portadores de LTA, em todas as manifestações clínicas da doença. Pissinate et al., 2008 observou que todos os isotipos específicos anti-*Leishmania*, exceto IgD, são detectados no soro de pacientes com LTA e que o uso dos isotipos de IgG aumentam a eficiência da técnica de citometria de fluxo para o diagnóstico.

Assim, para avaliar a aplicabilidade do isotipo IgG em identificar pacientes portadores de LTA ativa, foram utilizados 51 amostras de soros de pacientes e aqueles que apresentaram a porcentagem de parasitas fluorescentes positivos (PPFP) >20% foram considerados positivos no ensaio de citometria de fluxo, onde o teste conseguiu identificar como positivo 88,23% dos pacientes testados antes do tratamento (AT), como demonstrado na Figura 1. Esse resultado corrobora com estudos semelhantes que utilizam a citometria de fluxo para diagnosticar pacientes portadores de LTA, como os trabalhos de PEREIRA *et al.* (2012) e OLIVEIRA *et al.* (2013). Onde, através da citometria de fluxo (CF) detectaram anticorpos anti-*Leishmania* circulantes para identificar indivíduos com doença ativa e monitorar a cura após-tratamento quimioterápico da LTA, utilizando parasitos vivos e parasitos mortos fixados. Esses resultados vem impulsionando a idéia do uso dessa tecnologia como uma técnica para diagnosticar essa doença, uma vez que já é utilizado para diagnosticar outras doenças como alguns tipos de câncer, segundo descrito por KEENEY;

HEDLEY; CHIN-YEE (2017). A reatividade do ensaio de citometria de fluxo foi testada em ensaios anteriores do grupo (OLIVEIRA, 2013), a partir das diluições testadas do conjugado IgG (1:100 a 1: 6400), obtidas após incubação com os soros CP (controle positivo) e com soros CN (controle negativo), nas diluições de 1:64 a 1:8192, com promastigotas fixadas, em condições previamente padronizadas.

Figura 1 - Avaliação da aplicabilidade do anticorpo IgG na identificação de pacientes com LTA ativa.



Fonte: Elaborado pela autora pelo programa MedCalc Statistical. **Nota:** Avaliação da aplicabilidade do isotipo IgG para o ensaio de citometria de fluxo.

3.2. Avaliação de pacientes após 5 meses de tratamento

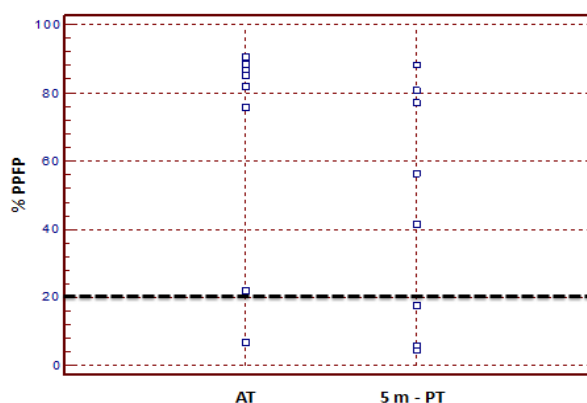
O critério de cura atual para a LTA é clínico, com a cicatrização completa das lesões e com isso diversas abordagens vêm sendo estudadas na tentativa de implementar um método para acompanhamento do paciente após o tratamento quimioterápico e determinar um critério de cura laboratorial. Com essa perspectiva, os testes sorológicos demonstram um papel importante como um indicador para monitoramento da evolução do paciente até a cura. Brito e colaboradores (2001) observaram uma redução nos títulos de IgG após os pacientes iniciarem o tratamento quimioterápico. Trabalhos como os de Amato e colaboradores (1998) e o de Mendonça e colaboradores (2004) sugerem o uso das técnicas de IFI e ELISA como abordagens sorológicas para acompanhamento do paciente e posteriormente comprovar a cura, através da avaliação quantitativa de anticorpos IgG no soro, ao longo do seu tratamento. GOMES *et al.*, 2014 descreveu algumas limitações que ambas as técnicas podem apresentar, principalmente ligada a baixa sensibilidade, especificidade e presença de reatividade cruzada com outros tripanossomatídeos dificultando o uso dessas técnicas para determinar um critério de cura.

Desse modo, para avaliar a aplicabilidade do isotipo IgG como critério de cura para pacientes portadores LTA após início do tratamento quimioterápico, foi realizado um ensaio inicial

comparativo utilizando amostras de 8 pacientes antes do tratamento e amostras dos mesmos pacientes após 5 meses do início do tratamento. Esses pacientes estavam sendo tratados com uma dose de 15ml/kg da droga Glucantime por 20 dias, que corresponde a um ciclo da medicação. Para os resultados, aqueles que apresentaram a porcentagem de parasitas fluorescentes positivos (PPFP) $>20\%$ foram considerados positivos no ensaio de citometria de fluxo. O teste conseguiu identificar como positivo 87,5% (7/8) dos pacientes testados antes do tratamento (AT), como demonstrado na Figura 2. Para os pacientes 5 meses após início do tratamento, o teste identificou como positivo 62,5% (5/8) dos pacientes (Figura 2). A reatividade do ensaio de citometria de fluxo foi testada em ensaios anteriores do grupo (OLIVEIRA, 2013), a partir das diluições testadas do conjugado IgG (1:100 a 1: 6400), obtidas após incubação com os soros CP (controle positivo) e com soros CN (controle negativo), nas diluições de 1:64 a 1:8192, com promastigotas fixadas, em condições previamente padronizadas.

A partir desses resultados novamente é possível observar que a citometria de fluxo é aplicável ao diagnóstico da LTA, pois a técnica identificou 87,5% do total de pacientes, porém para os pacientes após o tratamento os títulos não demonstraram diferenças significativas em relação as amostras obtidas antes do início do tratamento. Novamente, os trabalhos de PEREIRA *et al.* (2012) e OLIVEIRA *et al.* (2013), avaliaram a possibilidade do uso da citometria de fluxo como ferramenta para analisar a redução dos níveis de anticorpos utilizando amostras de pacientes submetidos ao tratamento com períodos de 1,2 e 5 anos e observaram uma redução relevante desses títulos ao longo dos anos. Sugerindo que, para os resultados obtidos no presente trabalho em relação ao critério de cura, para um período de 5 meses ainda não é possível observar diferenças significativas entre os títulos do paciente antes e depois de iniciar o tratamento. Sendo necessário um período maior do tratamento para início da redução significativa dos títulos.

Figura 2 - Avaliação da aplicabilidade do o anticorpo IgG na avaliação de pacientes após o tratamento.



Fonte: Elaborado pela autora pelo programa MedCalc Statistical. **Nota:** Avaliação da aplicabilidade do isotipo IgG para o ensaio de citometria de fluxo. AT = Antes do tratamento; PT= após o tratamento; 5m = 5 meses.

4 CONCLUSÕES

O presente trabalho demonstrou o uso imunoglobulina G através da citometria de fluxo como uma abordagem possível de ser empregada para o diagnóstico da LTA, uma vez que o teste se mostrou positivo para pacientes com a forma ativa da doença, contribuindo para o diagnóstico com uma técnica sensível. Em contrapartida, os resultados obtidos para determinação do critério de cura, comparando soros de pacientes antes e 5 meses após o tratamento, não demonstraram diferença significativa entre os títulos mesmo o teste já consiga identificar como negativo uma pequena porcentagem dos pacientes em tratamento. Assim, esses resultados sugerem que é necessário um intervalo maior de tempo no tratamento desses pacientes para que seja possível observar uma redução significativa dos títulos e assim determinar o critério de cura por citometria de fluxo, permanecendo como perspectiva a continuação do acompanhamento dos pacientes ao longo do tratamento.

REFERÊNCIAS

AMATO, V. S. D, *et al.*. An evaluation of clinical, serologic, anatomopathologic and immunohistochemical findings for fifteen patients with mucosal leishmaniasis before and after treatment. *Revista do Instituto de Medicina Tropical*, v. 40, n. 1, p. 23-30, Jan/Fev 1998.

ARONSON, Naomi et al. Diagnosis and treatment of leishmaniasis: clinical practice guidelines by the Infectious Diseases Society of America (IDSA) and the American Society of Tropical Medicine and Hygiene (ASTMH). *Clinical infectious diseases*, v. 63, n. 12, p. e202-e264, 2016.

BACELLAR, Olívia et al. Up-regulation of Th1-type responses in mucosal leishmaniasis patients. *Infection and immunity*, v. 70, n. 12, p. 6734-6740, 2002.

BRANDÃO-FILHO, Sinval P. et al. American cutaneous leishmaniasis in Pernambuco, Brazil: eco-epidemiological aspects in "Zona da Mata" region. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 89, n. 3, p. 445-449, 1994.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. – Editora do Ministério da Saúde, 2017.

BRITO, M. et al. Dynamics of the antibody response in patients with therapeutic or spontaneous cure of American cutaneous leishmaniasis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 95, n. 2, p. 203-206, 2001.

DE LUCA, Paula Mello; MACEDO, Amanda Beatriz Barreto. Cutaneous leishmaniasis vaccination: a matter of quality. *Frontiers in immunology*, v. 7, p. 151, 2016.

DE OLIVEIRA, A. P. et al. Comparison of flow cytometry and indirect immunofluorescence assay in the diagnosis and cure criterion after therapy of American tegumentary leishmaniasis by anti-live *Leishmania (Viannia) braziliensis* immunoglobulin G. *J Immunol Methods*, v. 387, n. 1-2, p. 245-53, Jan 31 2013.

DE PAIVA-CAVALCANTI, M. et al. Leishmaniasis diagnosis: an update on the use of immunological and molecular tools. *Cell & bioscience*, v. 5, n. 1, p. 1, 2015.

FAGUNDES-SILVA, G. et al. Decrease in anti-*Leishmania* IgG3 and IgG1 after cutaneous leishmaniasis lesion healing is correlated with the time of clinical cure. *Parasite immunology*, v. 34, n. 10, p. 486-491, 2012.

FERREIRA, Cassio Porto et al. Descrição de aspectos clínicos e laboratoriais de pacientes com esporotricose e leishmaniose tegumentar americana, com ênfase em mulheres grávidas. 2018. Tese de Doutorado.

GOMES, C. M. et al. Complementary exams in the diagnosis of American tegumentary leishmaniasis. *Anais brasileiros de dermatologia*, v. 89, n. 5, p. 701-709, 2014.

GOTO, Hiro; *et al.* Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Expert review of anti-infective therapy*, v. 8, n. 4, p. 419-433, 2010.

GUTIERREZ, Y. et al. Correlation between histopathology, immune response, clinical presentation, and evolution in *Leishmania braziliensis* infection. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, v. 45, n. 3, p. 281-289, 1991.

KEENEY, M.; HEDLEY, B. D.; CHIN-YEE, I. H. Flow cytometry—recognizing unusual populations in leukemia and lymphoma diagnosis. *International journal of laboratory hematology*, v. 39, p. 86-92, 2017.

MARTINS-FILHO, O. A. et al. Flow cytometry, a new approach to detect anti-live trypomastigote antibodies and monitor the efficacy of specific treatment in human Chagas' disease. *Clinical and diagnostic laboratory immunology*, v. 2, n. 5, p. 569-573, 1995.

MENDONÇA, M. G. et al. Persistence of *Leishmania* parasites in scars after clinical cure of american cutaneous leishmaniasis: is there a sterile cure? *Journal of Infectious Diseases*, v. 189, n. 6, p. 1018-1023, 2004.

NEGRÃO, Glauco Nonose; FERREIRA, Maria Eugênia Moreira Costa. Considerações sobre a leishmaniose tegumentar americana e sua expansão no território brasileiro. *Revista Percurso*, v. 6, n. 1, p. 147-168, 2014.

NEVES, D. P. *Parasitologia humana*. Atheneu, 2002. ISBN 8573792434.

PEDRAL- SAMPAIO G., et al. Detection of IgG Anti-*Leishmania* Antigen by Flow Cytometry as a Diagnostic Test for Cutaneous Leishmaniasis. *PloS one*, , 2016.

PEDRAS, M. J. et al. Antibody subclass profile against *Leishmania braziliensis* and *Leishmania amazonensis* in the diagnosis and follow-up of mucosal leishmaniasis. *Diagnostic microbiology and infectious disease*, v. 47, n. 3, p. 477-485, 2003.

PEREIRA, V. R. et al. Evaluation of anti-lived and anti-fixed *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* promastigote IgG antibodies detected by flow cytometry for diagnosis and post-therapeutic cure assessment in localized cutaneous leishmaniasis. *Diagn Microbiol Infect Dis*, v. 74, n. 3, p. 292-8, Nov 2012.

PISSINATE, J. F. et al. Upgrading the flow-cytometric analysis of anti-*Leishmania* immunoglobulins for the diagnosis of American tegumentary leishmaniasis. *Journal of immunological methods*, v. 336, n. 2, p. 193-202, 2008.

REITHINGER, R. et al. Cutaneous leishmaniasis. *The Lancet infectious diseases*, v. 7, n. 9, p. 581-596, 2007.

RODRIGUEZ, V.; CENTENO, M.; ULRICH, M. The IgG isotypes of specific antibodies in patients with American cutaneous leishmaniasis; relationship to the cell-mediated immune response. *Parasite immunology*, v. 18, n. 7, p. 341-345, 1996.

ROMERO, G. A. S. et al. Antibody response in patients with cutaneous leishmaniasis infected by *Leishmania (Viannia) braziliensis* or *Leishmania (Viannia) guyanensis* in Brazil. *Acta tropica*, v. 93, n. 1, p. 49-56, 2005.

SAVOIA, Dianella. Recent updates and perspectives on leishmaniasis. *The Journal of Infection in Developing Countries*, v. 9, n. 06, p. 588-596, 2015.

SOUZA, M. A. D. et al. Perfil de isotipos de imunoglobulinas e subclasses de IgG na leishmaniose tegumentar americana. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop*, v. 38, n. 2, p. 137-41, 2005.

SOUZA, S. et al. Development of a fluorescent based immunosensor for the serodiagnosis of canine leishmaniasis combining immunomagnetic separation and flow cytometry. *PLoS Negl Trop Dis*, v. 7, n. 8, p. e2371, 2013

TIUMAN, Tatiana S. et al. Recent advances in leishmaniasis treatment. *International Journal of Infectious Diseases*, v. 15, n. 8, p. e525-e532, 2011.

TRUJILLO, C. et al. The humoral immune response to the kinetoplastid membrane protein-11 in patients with American leishmaniasis and Chagas disease: prevalence of IgG subclasses and mapping of epitopes. *Immunology letters*, v. 70, n. 3, p. 203-209, 2000.